

# **4-(2-FORMYLAMINOVINYL)PHENOL, ITS SALT AND ITS PREPARATION**

Publication number: JP59175891 (A)

Publication date: 1984-10-04

Inventor(s): UMEHARA KAZUYOSHI; YOSHIDA KEIZOU; KOUSAKA MASANOBU; IMANAKA HIROSHI \*

Applicant(s): FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO \*

Classification:

- international: A61K31/135; A61K31/165; A61P7/02; C07C231/00; C07C233/18; C07C67/00; C12P7/24; A61K31/135; A61K31/165; A61P7/00; C07C231/00; C07C233/00; C07C67/00; C12P7/24; (IPC1-7): A61K31/135; C07C103/38; C12P7/24

- European:

Application number: JP19830053250 19830328

Priority number(s): JP19830053250 19830328

Abstract of JP 59175891 (A)

NEW MATERIAL 4-(2-Formylaminovinyl)phenol or a salt with it and an organic or inorganic base.  
EXAMPLE 4-(2-Formylaminovinyl)phenol USE: Useful as an inhibitor of blood platelet aggregation.  
PREPARATION A fungus such as *Aspergillus fumigatus* Fresenius No.5239 (FERM- P 6990) belonging to the genus *Aspergillus*, capable of producing 4-(2- formylaminovinyl)phenol at about 25-30 deg.C for about 50-100hr, and 4-(2-formylaminovinyl)phenol or its salt is collected from its culture solution.

\*\*\*\*\*  
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑮ 公開特許公報 (A)

昭59—175891

⑯ Int. Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑰ 公開 昭和59年(1984)10月4日
C 12 P 7/24		6760—4B	
A 61 K 31/135	A C B	7330—4C	発明の数 3
C 07 C 103/38		7375—4H	審査請求 未請求
⑱ C 12 P 7/24			
C 12 R 1/68 )			

(全 5 頁)

⑲ 4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノール、その塩およびそれらの製造法

⑳ 発明者 向阪正信  
堺市赤坂台5—26—8

㉑ 特 願 昭58—53250  
㉒ 出 願 昭58(1983)3月28日

㉓ 発明者 今中宏  
大阪府三島郡島本町桜井4—19—25

㉔ 発明者 梅原万義  
芦屋市朝日ヶ丘町10—35—613

㉕ 出願人 藤沢薬品工業株式会社  
大阪市東区道修町4丁目3番地

㉖ 発明者 吉田啓造  
吹田市山田4—41—3—509

㉗ 代理人 弁理士 青木高

明 細 書

1. 発明の名称

4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノール、

その塩およびそれらの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールまたはその塩。

(2) アスベルギルス属に属する4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールを生産する菌を培養し、得られる培養物から4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールまたはその塩を分離、採取することを特徴とする4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールまたはその塩の製造法。

(3) 4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールまたはその塩を有効成分とする血小板凝集阻害剤。

3. 発明の詳細な説明

この発明は新規な4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールまたはその塩に関する。さらに詳細には、この発明は血小板凝集阻害作用を有する4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールまたはその塩、それらの製造法およびそれらを含む有効成分とする血小板凝集阻害剤に関する。

4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールの塩類としては4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールと有機塩基または無機塩基との塩(例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩、トリエチルアミン塩、エタノールアミン塩など)が挙げられる。

4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールの塩類としては4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールと有機塩基または無機塩基との塩(例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩、トリエチルアミン塩、エタノールアミン塩など)が挙げられる。

この発明の発明者社士等から新しく分離したアスベルギルス属に属する菌が新規な4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールを生産することを見出し、その化学構造を解明してこの発明を完成した。

(1) 4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールの製造法

4—(2—ホルミルアミノピニル)フェノールは例えばアスベルギルス・フミダスのようなア



ることができる。

4-(2-ホルミルアミノピニル)フェノールの生産はアパルゲルス法に準ずる4-(2-ホルミルアミノピニル)フェノール生産法を精製に特許することによって行われる。培養方法は原則的には一般微生物の培養方法に準ずるが、通常は液体培地による菌体培養法が有利である。培養に用いられる培地としては、合成培地、半合成培地あるいは天然培地が用いられ、培地組成としては、たとえばグルコース、シュクロース、グリセリン、デキストリン、澱粉などが炭素源として用いられ、また固形カス、ペプトン、カゼイン加水分解物、グルタミン、コーンミール、硫酸銅、ビタミンB<sub>12</sub>、コーンステアザリカー、葉綠素、鉄酢アンモニウム、銅酢アンモニウム、炭素などの有機または無機の栄養源が用いられる。また炭酸カルシウムなどの有機の炭酸塩、硝酸2水素カリウム、硝酸水素2カリウムなどの金属の炭酸塩、塩化マグネシウムなどの無機の塩化物が通常、添加される。培養中細胞の毒しいときには、

— 7 —

任意の順序に組み合わせ、また反覆して試験から有効物質の分離、精製、同定を行なう。

(2) 4-(2-ホルミルアミノピニル)フェノールの物理化学的性質  
次に表1に実施例1で得られた4-(2-ホルミルアミノピニル)フェノールの物理化学的性質を示す次の通りである。

①結晶の色と形状：無色の針状結晶 ( $C_9H_9NO_2$ ,  $1/8 H_2O$ )

② 塩基性、酸性、中性の区別：酸性物質

③融点：142～145℃(エタノールから結晶化)

④分子量：163.3 (マススペクトルによる)

⑤元素分析：

計算値 ( $C_9H_9NO_2$  として)

C 66.24, H 5.56, N 8.80 (%)

実験値

C 65.27, H 5.42, N 8.85 (%)

⑥紫外線吸収スペクトル：

$\lambda_{max}^{NaOH}$  : 277nm ( $\epsilon=15600$ )

高濃アルコール、糖類、シリコン化合物などの溶媒を加えるとよい。またこれらの溶媒剤のうち、糖類は炭素源として使用してもよい。培養温度は25～30℃前後が適当であり、培養容量の増大に従って適宜増量をなすと結果が得られることが多い。本培養の培養時間は50～100時間ぐらいが適当であり、培地の濃度化によって培養時間をさらに延長してもよい。

以上述べた培養条件は使用生産菌株の特性に応じてそれぞれ最適な条件を選択して適用される。

このようにして培養物中に蓄積された化合物は主に培養液中に含まれているので、遠心分離またはろ過により固体を除去した後、母液から一有機生物質の製造に用いられる手順によって分離、採取、精製される。すなわち、減圧濃縮、凍結乾燥、希薄抽出、蒸気蒸餾、例えば他イオン交換樹脂、陽イオン交換樹脂、青イオン交換樹脂などの樹脂による処理、例えば活性炭、わけい、シリカゲル、セルロース、アルミナなどの吸着剤による処理、結晶化、再結晶などの手段を単独、あるいは

— 8 —

⑦赤外線吸収スペクトル：

$\nu_{max}^{NaOH}$  : 3300, 3200, 2920, 2860, 1670, 1650, 1607, 1585, 1510, 1490, 1460, 1410, 1380, 1330, 1312, 1260, 1270 (OH), 1255, 1210, 1175, 1105, 1040, 1020, 940, 855, 840, 825, 810, 765, 755, 780 (OH), 655  $cm^{-1}$

⑧<sup>1</sup>H核磁気共鳴スペクトル：

$\delta$  (ppm) (DMSO- $d_6$ ) : 5.60 (1H, d, J=0.1Hz), 6.55-6.8 (1H, m), 6.78 (2H, d, J=0.1Hz), 7.22 (2H, d, J=0.1Hz), 8.12 (1H, s), 9.46 (1H, s) ( $D_2O$  で消失), 9.77 (1H, s) ( $D_2O$  で消失)

⑨母液に対する溶解性：

易溶：メタノール、エタノール、アセトン

難溶：酢酸メチル、クロロホルム、水

不溶：ヘキサン

⑩染色反応：

塩化第2鉄反応：陽性

以上の物理化学的性質および別添イの結果から

アスルギルム・フリガタス・フレキニウス属  
5239株が生産することの発明に関わる物質が4  
- (2-ホルミルアミノビニル)フェノールである  
ことが判明した。

(4) 4- (2-ホルミルアミノビニル)フェノ  
ールの生物学的性質

次に4- (2-ホルミルアミノビニル)フェノ  
ールの生物学的性質を示す次の通りである。

① 試験管内血小板凝集阻止反応方法：

うさぎ(日本白色系豚)の新鮮肝、または  
雄豚脾から、あらかじめ血容量の10%相当量  
の3.8%クエン酸ナトリウムを入れて凍結した  
試験管に採血する。この血液を15.0℃で  
10分(10℃)で速く分離し、上層を抽出し  
ベットでポリエチレン製ビーカーにとり、(血  
小板含有血清(以下P.R.Fと記す))とする。

血小板凝集反応は次の様に行なう。既ち  
P.R.F(4.0万細胞/mm<sup>3</sup>)0.35mlおよび4-  
(2-ホルミルアミノビニル)フェノール濃  
0.02%を混合し、これに下記の経常培養液0.05

mlを添加し、発光度の変化を5.55000プロ  
ムサンブル・アプレゴメータ(DP-247型)  
(感度57℃、標準1000XPD)で測定する。  
凝集阻害率は次のようにして測定する。

A) アキドン酸(シダマ社製)

5.00mlを5mlになるように生理食塩水で  
希釈して使用する。

B) コーゲン(牛のアナレス製出来)(求  
栄化成物)：

生理食塩水10mlにコーゲン2.00mgを  
加え冷却しながら超音波処理(5A、8分)  
し、大ききかたまりをグラントし上清を使用  
する。使用にあたって、適当な濃度で生理食  
塩水で希釈する。

結果：

血小板凝集阻害剤	4- (2-ホルミルアミノビニル)フェノールが 血小板凝集を50%阻止 する濃度(IC <sub>50</sub> )(μg/ml)
アキドン酸	1.25
コーゲン	5

- 11 -

② マウスのアキドン酸血液に対する効果的方法：

アキドン酸(シダマ社製)を5%エタノール  
中に5mg/mlの濃度になるように0.2%炭酸ナ  
トリウム溶液で調整する。個々の濃度の生理食塩水  
に溶解した4- (2-ホルミルアミノビニル)フ  
ェノールをマウスの腹腔内に投与し、5.0分後  
にアキドン酸溶液の0.2mlをマウス腹腔内より  
静注する。2時間後のマウス生存率をもって効果  
を判定する。

結果：

4- (2-ホルミルアミノビニル)フェノールの投与 (mg/kg)	2時間後の生存率 (%)
5.0	0.0
1.0	4.0
生理食塩水	1.0

1群10匹

③ 急性毒性：

マウス(♂♂)

LD<sub>50</sub>: 400mg/kg (静脈内注射)

次にこの発明を実施例により説明する。

実施例1

糖粉1g、グルテンミール1g、乾燥酵母0.5  
g、コンスタック・アリカー0.5g、アデカノール  
(原簿：旭電化株式会社製)0.05gの組成の培  
地を5.00mlをコルベンス中にそれぞれ1.00ml  
ずつ分注し、滅菌をして12.0℃で2.0分間滅菌  
した。各培地にアスルギルム・フリガタス・フ  
レキニウス属5239株の斜面培養物1.0gをす  
つと接種し、5.0℃で3日間培養した。別培、糖  
粉5g、グルテンミール0.5g、乾燥酵母0.5g  
、ビナツミール0.5g、炭酸ナトリウム0.06  
g、アデカノール0.1gの組成の培地2.0gを  
5.0gのビナツミール・ファクタに注し、12.0  
℃で2.0分間滅菌した後、上記培養物の全量を接  
種し、5.0℃で3日間培養した。

培養終了後、培養物にけい薄土4.0gを添加  
し、混合した。得られた西液を水酸化ナトリウム  
にてpH7.0に修正し、吸光度をpH2.0(商  
標：三養化成工業株式会社製)を5gを充てんし

たカラムに吸着させ、9.5の水で洗った後、メタノール2.5で活性物質を溶出した。吸出液を減圧濃縮し、濃縮液を9H<sub>2</sub>Oに溶解した後、酢酸エチル1.5で2回抽出した。抽出液を濃縮し抽出物質を湯洗。これを2.0日時のジリカゲルを充てんしたカラムタロマトグラフィーに付した。活性区分を酢酸エチルで溶出した。このカラム操作をもう一度繰り返すと、活性フラクションから4-(2-ホルミルアミノピロル)フェノールが結晶として、6日取得された。なお、新製工程における活性の精査は、由小振動集阻留作用をもって測定した。

出願人 藤沢薬品工業株式会社

代理人 弁護士 青木 茂

